

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. В.И. Ульянова-Ленина

На правах рукописи

ЛАТЫПОВ Олег Рустамович

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ БЕТА-ПРОПЕЛЛЕРНЫХ БЕЛКОВЫХ
ДОМЕНОВ, ГОМОЛОГИЧНЫХ ФОЛДОНУ ФИБРИТИНА
БАКТЕРИОФАГА T4

Специальность 03.00.04. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2008

Работа выполнена в лаборатории вирусов микроорганизмов Института Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Летаров Андрей Викторович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна
доктор биологических наук,
Шевелев Алексей Борисович

Ведущая организация: Институт Вирусологии
им. Д.И. Ивановского РАМН, г. Москва

Защита диссертации состоится 24 апреля 2008 года в часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, аудитория 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина

Автореферат разослан «___» марта 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Фибриллярный аппарат бактериофагов представляет собой уникальный объект для исследований, интерес к которому не ослабевает уже многие годы. В первую очередь, фаговые фибриллы привлекательны для исследователей простотой своего строения, которая при этом, в ряде случаев, сопряжена с бифункциональной нагрузкой. Кроме того, гены, кодирующие фибриллярный аппарат являются наиболее пластичным компонентом фаговых геномов, а потому представляют немалый интерес для исследования эволюции бактериофагов.

Одним из наиболее исследованных на данный момент фаговых фибриллярных белков является фибритин бактериофага Т4 (Letarov *et al.*, 2005). Фибритин представляет собой комплекс «воротничок-бакенбарды», и кодируется геном *wac*. «Бакенбарды» представляют собой шесть фибрилл длиной 480 Å, отходящих от шейки фаговой частицы (Coombs *et al.*, 1977). Эти фибриллы способны временно связываться с длинными хвостовыми фибриллами (ДХФ) и должным образом ориентировать их для присоединения к базальной пластинке при сборке фаговой частицы (Efimov *et al.*, 1994). Кроме того, «бакенбарды» в случае бактериофага Т4 несут функцию молекулярного сенсора, предотвращающего инфекцию в неблагоприятных условиях (например, высокая ионная сила раствора, низкий pH). Данный сенсор функционирует за счет временного связывания С-концевого домена фибритина («бакенбарды») со средним участком ДХФ, что обеспечивает удерживание последней в поднятом состоянии (Conley *et al.*, 1975). Фибритин представляет собой тримерную альфа-спиральную coiled-coil структуру, фланкированную маленькими глобулярными N- и С-концевыми доменами (Efimov *et al.*, 1994). В то время как N-домен (50 а.о.) необходим для прикрепления тримера к «шейке» бактериофага, С-концевой домен, состоящий из 30 а.о., является затравкой фолдинга всей молекулы (фолдоном), а также играет важную роль в упомянутом выше связывании с ДХФ (Letarov *et al.*, 1999).

Механизм инициации фолдинга фибритина бактериофага Т4 на данный момент описан весьма подробно (Guthe *et al.*, 2004, Meier *et al.*, 2004). Методами рентгеноструктурной кристаллографии и ЯМР было показано, что гидрофобный кор и межмолекулярные связи внутри тримерной молекулы формируются за счет аминокислотного мотива GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL. Данный мотив (фолдон), в процессе фолдинга образует бета-шпильку, взаимодействие которой с такими же шпильками на двух других цепях фибритина приводит к образованию так называемой бета-пропеллерной структуры. Бета-пропеллер, как было показано в нескольких работах, является необходимым для эффективной

инициации тримеризации и последующего фолдинга фибритина. Способность фолдона фибритина фага Т4 к автономной тримеризации может быть использована при конструировании искусственных химер, например, как это было сделано в случае получения гибридного белка, состоящего из фолдона на N-конце, слитого с последовательностью бета-спиральной тримерной фибриллы аденовируса (Papanikolopoulou *et al.*, 2004).

Современная биотехнология и практическая молекулярная биология испытывают острую необходимость в новых методах получения тримерных химерных белков. Без привнесения в аминокислотную последовательность надежных доменов, инициирующих тримеризацию, очень сильно усложняется исследование трансмембранных тримерных белков, а также отдельных доменов тримерных фибриллярных белков. Физико-химические характеристики обнаруженной в последовательности фибритина бактериофага JS98C3 новой разновидности бета-пропеллерного фолдона делают его крайне перспективным в отношении использования в белковой инженерии как домена, инициирующего тримеризацию химерных белков.

Цели и задачи исследования

Цель проделанной нами работы – исследовать распространенность и разнообразие белковых доменов, гомологичных фолдону фибритина бактериофага Т4 и охарактеризовать некоторые из них.

Задачи исследования состояли в следующем:

1. Поиск бактериофага, имеющего фибритин с фолдоном, отличающимся по аминокислотной последовательности от фолдона фибритина бактериофага Т4.
2. Дифференциальная физико-химическая характеристика фибритина вновь обнаруженного фага и его делеционных вариантов.
3. Поиск новых белковых доменов, гомологичных фолдону фибритина бактериофага Т4 методами биоинформатики.
4. Моделирование вторичных и третичных структур обнаруженных нами доменов *in silico*.

Научная новизна и практическая значимость работы

До последнего времени фолдон фибритина бактериофага Т4 считался уникальной структурой. Впервые было продемонстрировано широкое распространение бета-пропеллерных белковых доменов, гомологичных фолдону фибритина, причем большая часть выявленных гомологов данной структуры была обнаружена в последовательности белков бактериофагов, не родственных Т4. Также была показана возможность отклонения аминокислотной последовательности бета-пропеллерных доменов от «канонической» последовательности фолдона фибритина фага Т4. *In silico* моделирование третичной структуры одного из подобных доменов, обнаруженного в

последовательности фибритина бактериофага JS98C3 показало вероятное наличие в ней дополнительного участка альфа-спирали, что делает конформацию данного фолдона более энергетически выгодной и более прочной, чем у фолдона фибритина бактериофага T4. Исследование физико-химических свойств данной структуры *in vitro* с высокой степенью достоверности подтвердило результаты моделирования.

Дальнейшее исследование аминокислотного «контекста», в котором были обнаружены многочисленные гомологи фолдона фибритина бактериофага T4, в перспективе позволит получать химерные белковые конструкции с большей, чем в настоящий момент, эффективностью.

Положения, выносимые на защиту

1. В С-концевом домене фибритина бактериофага JS98C3 обнаружены два аминокислотных домена, гомологичных фолдону фибритина фага T4. Данные домены, несмотря на имеющиеся отличия от последовательности фолдона фибритина бактериофага T4, способны к автономной тримеризации.

2. С-концевой фолдон фибритина фага JS98C3 превосходит по прочности фолдон фибритина фага T4 и может быть применен в белковой инженерии в качестве более надежного домена, инициирующего тримеризацию химерных белков.

3. Фолдон фибритина бактериофага T4 не является уникальной структурой. Его гомологи широко распространены среди бактериофагов, относящихся к семействам *Myoviridae* и *Siphoviridae*.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на международной конференции «1st Texas – Evergreen Phage/Virus Genomics and Ecology Meeting», а также Всероссийской молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии – 2005» и «Актуальные аспекты современной микробиологии – 2006».

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано и сдано в печать 8 печатных работ (4 статьи и 4 тезиса).

Место проведения работы

Работа выполнена в лаборатории вирусов микроорганизмов Института Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Спектры кругового дихроизма белков были получены в лаборатории структурной биологии Института Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 84 страницах машинописного текста и включает 22 рисунка и 2 таблицы. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, содержащей методы и результаты исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, который содержит 104 ссылки.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Методы исследования

Бактериальные штаммы и культивирование бактерий и бактериофагов. В качестве индикаторного штамма мы использовали дериват штамма *E. coli* K12 C600 (*F*-, *thi*-1, *thr*-1, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*). Для клонирования и получения плазмидной ДНК нами применялся штамм *E. coli* DH5 α (*F*-, *thi*-1, *gyrA96*, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*). Экспрессию гена *wac* проводили в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3) (*gal hsdS* (λ cl857 *ind*-1 *Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene*)).

Изоляция бактериофагов. Проба фекалий лошади (20 г) была гоменизована в 80 мл фагового буфера (0.2 М NaCl, 0.1 г/л азида натрия, 1 г/л Tween 20). Затем суспензия перемешивалась на роторной качалке 1 ч при комнатной температуре, после чего аликвоты были центрифугированы в течение 2 мин на микроцентрифуге при 12000 об/мин. Супернатант использовался для посева на газон индикаторного штамма.

Библиотека случайных клонов, клонирование и выделение плазмидной ДНК. Для получения случайных клонов ДНК бактериофага JS98C3, гидролизованную эндонуклеазой рестрикции DraI, осаждали этанолом, после чего ресуспендировали в деионизованной воде и клонировали в плазмидный вектор T-system PCR cloning kit (Promega, США) в соответствии с инструкциями производителя. В этот же вектор клонировали фрагмент генома фага JS98C3, кодирующий ген *wac*.

Для клонирования фрагментов гена *wac* фага JS98C3, кодирующих варианты С-концевого домена фибритина мы использовали плазмидный вектор pET-32a (Novagen, США).

Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, США).

ПЦР, олигонуклеотидные праймеры и секвенирование. Для ПЦР-амплификации и секвенирования случайных клонов из плазмидной библиотеки нами применялись стандартные праймеры M13F и Sp6 (Fermentas, Литва). Для обнаружения бактериофагов, родственных T4 мы применяли вырожденные олигонуклеотидные праймеры к гену 23, MZIA1bis (5'-GAT ATT TGI GGI GTT CAG CCI ATG A) и MZIA6 (5'-CGC GGT TGA TTT

CCA GCA TGA TTT C) в концентрации 0.5 пМ/мкл. Ген *wac* амплифицировали и секвенировали с использованием олигонуклеотидов JST12up (5'-AGT TAC CAT (T/A)(T/C)G TTG A(C/T)G GC), JS13lo (5'-ATA AAA AGC CTG ATA ACC TTT), JS98_wacM (5'-AAC CGA GTT GAT ATT CTG G) и jsNdlo (5'-TTT TTT CCA TGG TTA AGT GTC ATC AAG GAT TTC AGC CC). Для амплификации и секвенирования гена 36 использовали олигонуклеотиды JS98_35up (5'-GAA TTT GG(T/C) GT(A/C) AAT GGT ATT CG) и JS98_g37lo (5'-TCT TTT AAG TTA ATA GCC AG(C/T) TC(G/A) CCT TC(A/G) GC). Фрагменты С-концевого домена амплифицировали при помощи олигонуклеотидов js_Cd1up (5'-TTT TTT CCA TGG GTC AAA TGC CTA CTA AAT TGG G), js_Cd2up (5'-TTT TTT CCA TGG GTA CAG AAA TTG ATA CGG TC) и jsCdlo (5'-TTT TTT CTC GAG GCC CTT TTG TTA TGG TGC TGG G).

Электронная микроскопия. Каплю фагового лизата наносили на медную сетку с формвар-углеродным покрытием, после 5 мин инкубации на столе каплю отбирали фильтровальной бумагой. Затем препарат контрастировали 1%-ным уранилацетатом и исследовали при помощи электронного микроскопа Jeol 100S (Япония) при 25000х увеличении.

Экспрессия, выделение и очистка пг *wac* и вариантов его С-концевого домена. Экспрессию целевых белков в клетках *E. coli* BL21 (DE3), проводили согласно методам, описанным в руководстве Маниатис и соавторов. Биомассу осаждали центрифугированием при 6000g и температуре 4°C в течение 20 мин, после чего ресуспендировали осадок в буфере для лизиса (50 мМ натриево-фосфатный буфер (pH 7.0), 300 мМ NaCl). К клеточной суспензии добавляли лизоцим до 300 мкг/мл и ДНКазу I до 5 мкг/мл, после 20 мин инкубации на столе она была разрушена при помощи ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 10000 g и 4°C в течение 10 мин. К осветленному лизату по каплям при интенсивном перемешивании добавляли (NH₄)₂SO₄ до 25% от насыщения, затем после 20 мин инкубации при 4°C высоленный белок осаждался центрифугированием при 10000 g и 4°C в течение 10 мин. Грубую очистку целевого белка проводили несколькими циклами дифференциального высаливания насыщенным раствором сульфата аммония.

Варианты С-концевого домена пг *wac* очищали при помощи аффинной хроматографии на колонке с Co-NTA смолой Talon (Clontech, США) в соответствии с инструкцией производителя. После очистки раствор белка диализовали против 500 мл буфера для гидролиза тромбина (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) в течение ночи при 4°C.

После гидролиза тромбином, белки вновь диализовали против буфера для лизиса, затем проводили еще один цикл очистки на колонке с Co-NTA.

Степень очистки целевых белков оценивали при помощи ДСН-ПААГ электрофореза в 10% (пг *wac* и его N-концевой домен) или 15% (варианты

С-концевого домена) акриламидном геле по методике Лэммли (Fritch *et al.*, 1989).

Ограниченный протеолиз. К белку в буфере 50 мМ трис-НСl, pH 8.0, 1 мМ CaCl₂ добавляли трипсин (Serva, США) в различных соотношениях и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением ФМСФ до концентрации 2 мМ. Затем добавляли двукратный буфер для образцов, нагревали 3–5 мин в кипящей воде и наносили на ПААГ с ДСН.

Гидролиз тромбином. Для отщепления вариантов С-концевого домена пг *wac* от слитого с ними тиоредоксина, их обрабатывали сайт-специфической протеиназой тромбин (Novagen, США) согласно инструкции фирмы производителя. К 1 мл раствора целевого белка в концентрации 5 мг/мл в буфере для гидролиза тромбином добавляли 5 ед. активности тромбина, затем тщательно перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 часа.

Спектроскопия кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма целевых белков в дальнем ультрафиолете снимали при помощи спектрополяриметра Jasco J-810 (JASCO, Япония). Запись спектра производили при длине волны от 190 до 250 нм с шагом в 1 нм при 24°C. Полученные данные были проанализированы на предмет наличия вторичных структур при помощи последних версий программ CONTINLL и CDSSTR (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/>).

Предсказание вторичной и третичной структуры. Предсказанные аминокислотные последовательности мотивов пг *wac* бактериофага JS98C3, гомологичных фолдону фибритина фага Т4, а также данные, полученные в результате поиска их гомологов в GenBank (программа BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) анализировали при помощи программы Chimera. В качестве матрицы для построения моделей предполагаемых вторичных и третичных структур использовали модель фолдона фибритина бактериофага Т4, депонированную в Protein Data Bank по результатам рентгеноструктурного анализа (Guthe *et al.*, 2004).

2. Результаты исследования и их обсуждение

2.1. Выделение Т4-подобного бактериофага JS98C3. В лаборатории вирусов микроорганизмов Института Микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН уже продолжительное время ведется работа по исследованию смешанных бактериально-фаговых сообществ из кишечника лошади (Е.Е. Куликов и соавт., 2007). Мы провели скрининг коллекции полевых изолятов колифагов, полученных в ходе этого исследования, с целью обнаружения бактериофагов, родственных Т-чётным.

Вырожденные олигонуклеотидные праймеры к консервативным участкам гена 23, кодирующего основную субъединицу головки Т4-подобных

бактериофагов были подобраны в 2000 г. группой Н.М. Krisch (Tetart *et al.*, 2004). За прошедшие годы эти олигонуклеотиды зарекомендовали себя как надежное и удобное средство для быстрой идентификации бактериофагов, родственных Т4, а также установления их систематического положения (Nolan *et al.*, 2006, Yoshida *et al.*, 2006). Нами были проскринированы путем ПЦР-амплификации экстракты ДНК из 50 фаговых бляшек различной морфологии, высеянных из фекалий лошади. Только в одном случае был получен ПЦР-продукт, который имел размеры около 540 п.о. Данный ПЦР-продукт был секвенирован с тех же олигонуклеотидных праймеров. Поиск гомологий в базе данных GenBank дал 95%-ное совпадение с последовательностью гена 23 бактериофага JS98, изолированного группой Н. Brussow в 2004 г. в Бангладеш из стула педиатрических пациентов с симптомами диареи (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004). Сконцентрированный и очищенный дифференциальным центрифугированием препарат фага был исследован методами электронной микроскопии, его морфология оказалась крайне близкой к морфологии бактериофага Т4 (рис. 1).

Были секвенированы 3 случайных клона из полученной нами плазмидной библиотеки ДНК этого фага. Первый из этих клонов оказался фрагментом гена 55 (сигма-фактор РНК-полимеразы Т4-подобных фагов) и показал 88%-ное совпадение нуклеотидной последовательности с аналогичным геном фага JS98 (аминокислотная последовательность транслированного клона совпала на 96%). Последовательность второго клона, фрагмента гена 7 (одна из субъединиц базальной пластинки), имела гомологию в 87% (95% – в транслированном виде). Третий клон имел в транслированном виде 89% гомологию с предсказанной последовательностью большой субъединицы топоизомеразы II (пг 39) фага JS98. Нуклеотидные последовательности этих трех клонов депонированы в GenBank под номерами EF618561.1, EF618562.1 и EF618563.1 соответственно.

Таким образом, полученные данные подтвердили генетическое сходство фага JS98C3 с фагом JS98.

Физико-химические условия, с которыми сталкиваются бактериофаги и их хозяева в кишечнике лошади, имеют массу отличий от условий кишечника человека, из которого был изолирован фаг JS98. Мы сделали предположение, что в силу этих отличий, компоненты молекулярного сенсора фага JS98C3, ответственного за предотвращение инфекции в неблагоприятных условиях, должны нести соответствующие изменения.

2.2. Последовательность гена *wac*. ПЦР-амплификация с использованием подобранных нами вырожденных олигонуклеотидных праймеров с последующим секвенированием ПЦР-фрагмента позволила нам определить полную последовательность гена *wac* фага JS98C3. Нуклеотидная последовательность этого гена депонирована в GenBank под номером EU2244220. Предсказанная аминокислотная последовательность

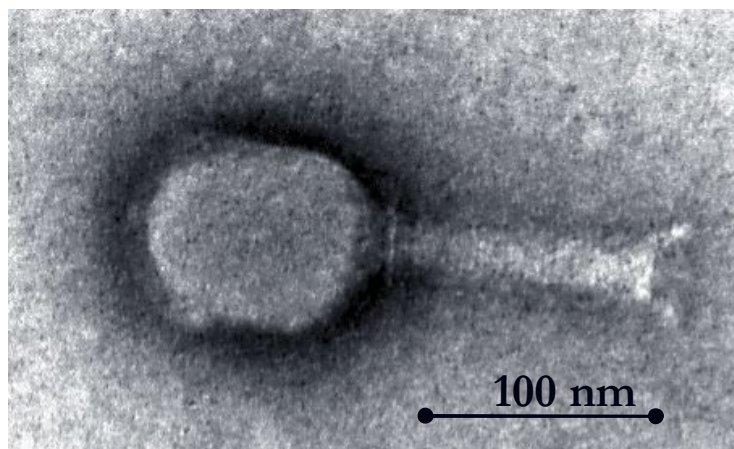


Рис. 1. Электронная микрофотография бактериофага JS98C3.

N'-концевого участка пг *wac* (а.о. 1–48), имеющая значительную гомологию с последовательностью фибритина фага T4, была практически идентичной в геномах фагов JS98C3 и JS98. Последующие 379 а.о. последовательности фибритинов фагов JS98C3 и JS98 также имеют высокую степень гомологии и сходны по своей гептадной coiled-coil периодичности с фибритином бактериофага T4. Однако пг *wac* JS98 имеет дополнительный С-концевой домен, отсутствующий в пг *wac* фага T4. Длина этого домена составляет 298 а.о. В фибритине фага JS98C3 также имеется «дополнительный» домен, однако его длина составляет только 54 а.о.

Последовательность С-концевой области пг *wac* фага JS98C3 почти идентична С-концевой последовательности пг *wac* фага JS98. Таким образом, по отношению к последнему пг *wac* фага JS98C3 имеет внутреннюю делецию 237 а.о. (Рис.2).

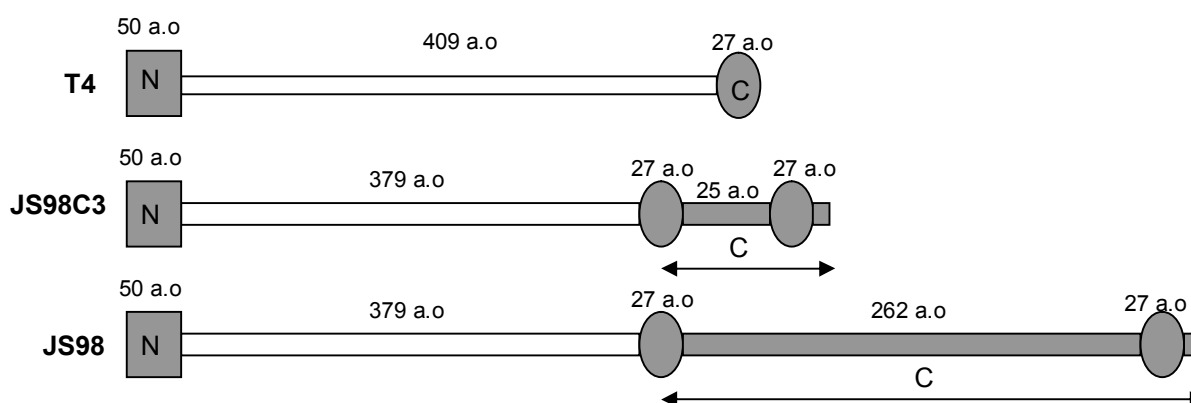


Рис. 2. Схема строения фибритинов бактериофагов T4, JS98 и JS98C3. Овалами отмечены аминокислотные последовательности фолдонов.

2.3. Последовательность гена 36. Продукт гена 36 является одним из компонентов молекулярного сенсора Т4-подобных бактериофагов. «Колено» ДХФ (pg36) принимает участие в первой стадии приведения фибрилл в состояние «up» в неблагоприятных условиях путем взаимодействия с С-концевым доменом фибритина. Для того, чтобы выяснить, отразилась ли обнаруженная нами делеция в гене *wac* на последовательности гена 36, нами были подобраны вырожденные олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие данный ген. Полученный ПЦР-фрагмент по размерам и нуклеотидной последовательности оказался очень близким к гену 36 фага JS98 (номер в GenBank EU224421). Аминокислотная последовательность, кодируемая данными генами, оказалась практически идентичной. Это говорит о том, что связывание ДХФ с фибритином у фагов JS98C3 и JS98 происходит за счет одинаковых белок-белковых взаимодействий.

2.4. Фибритин бактериофага JS98C3 и его свойства. Фрагмент генома фага JS98C3 содержащий ген *wac* с естественным сайтом инициации трансляции был амплифицирован при помощи олигонуклеотидов, комплементарных 3'-концу гена 12 и 5'-концу гена 13, и клонирован в плазмидный вектор pGEM-T. ПЦР-амплификацией были отобраны клоны с ориентацией вставки, совпадающей с ориентацией промотора T7 РНК-полимеразы.

Для нативной тримерной молекулы фибритина была показана способность к ренатурации после нагревания, а также свойства ограниченной устойчивости к ДСН (додецилсульфату натрия) и ограниченной устойчивости к действию протеаз (Boudko *et al.*, 2002). Экспрессия гена *wac* в клетках *E. coli* BL21 (DE3) под контролем T7 промотора привела к суперпродукции растворимого и ограниченно ДСН-устойчивого фибритина. Олигомерность белка анализировали путем электрофореза в 10% ДСН-ПААГ, на который наносили препараты белка в стандартном ДСН-буфере для образцов. Образцы были нанесены в двух вариантах: в первом варианте перед нанесением их прогревали 3–5 мин на кипящей водяной бане, во втором варианте их наносили сразу же после смешивания белкового препарата с буфером для образцов (рис. 3).

Не прогретые образцы после окрашивания давали тонкую, высокоплотную полосу в верхней части геля, которая свидетельствует о том, что целевой белок находится в ДСН-устойчивом олигомерном состоянии.

Для подтверждения того, что фибритин фага JS98C3 образует компактную нативную структуру, мы подвергли его ограниченному протеолизу. К очищенному препарату фибритина в буфере для гидролиза мы добавляли трипсин в разных концентрациях.

После 30 мин гидролиза при 37°C мы останавливали реакцию добавлением ФМСФ и анализировали продукты гидролиза электрофорезом в 10% ДСН-ПААГ (рис. 3)

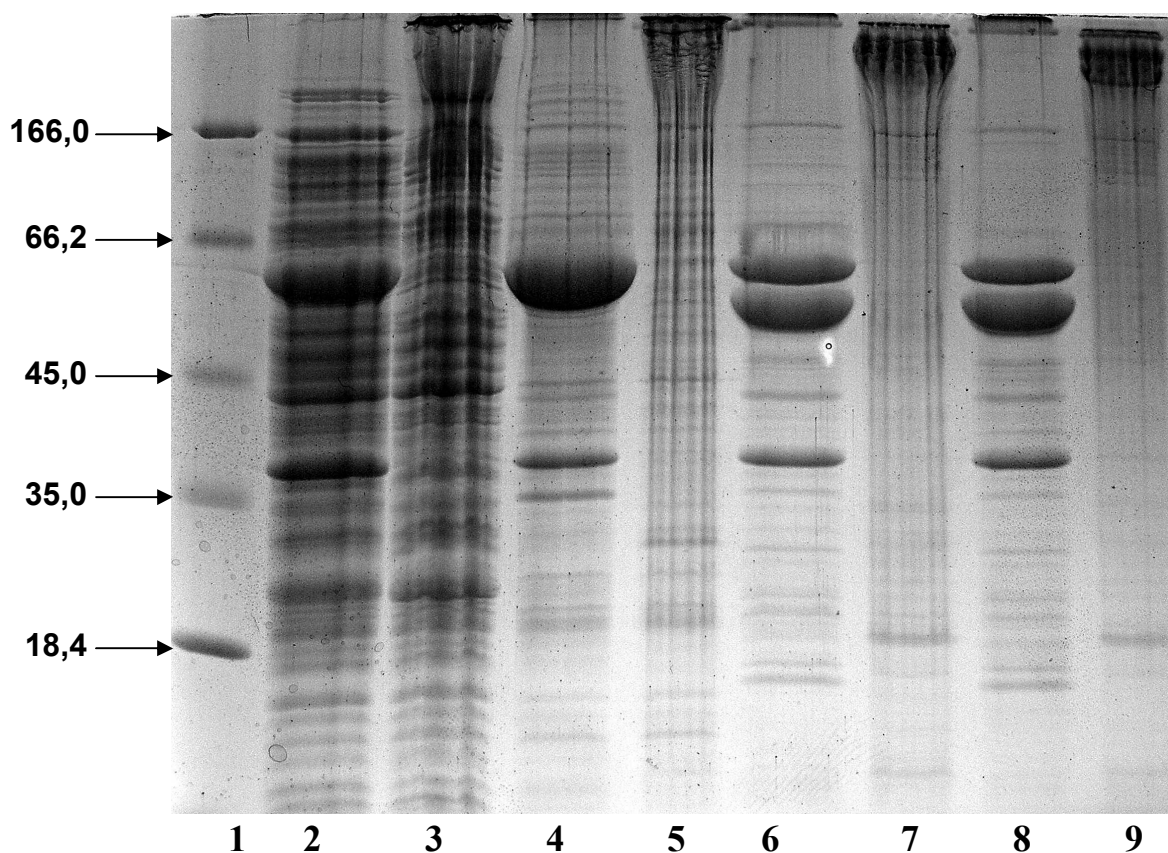


Рис. 3. Анализ экспрессии пг was фага JS98C3 и его трипсинолиза в 10% ПААГ-ДСН: 1 – маркеры молекулярного веса; 2 – осветленный лизат; 3 – не прогретый перед нанесением осветленный лизат в ДСН-буфере для образцов; 4 – высоланный препарат пг was; 5 – тот же препарат, не прогретый перед нанесением; 6 – пг was после обработки трипсином в концентрации 0,01 мг/мл; 7 – он же, не прогретый перед нанесением; 8 – пг was после обработки трипсином в концентрации 0,05 мг/мл; 9 – тот же препарат, не прогретый перед нанесением.

Анализ геля показал, что молекулярная масса пг was после гидролиза трипсином несколько уменьшается, однако, даже при внесении трипсина до концентрации 0.05 мг/мл данный белок не гидролизуеться полностью и остается олигомерным. Это свидетельствует об эффективном сворачивании исследуемого белка в компактную нативную структуру. Следовательно, имеющаяся делеция в «дополнительном» С-концевом домене не препятствует нормальному фолдингу этого белка.

2.5. Фибритин фага JS98C3 с делецией части С-концевого домена. Для установления влияния С-концевого домена на фолдинг пг was фибритина фага JS98C3, нами был получен его делеционный вариант,

оканчивающийся на С-конце стоп-кодом в регионе, в котором происходит терминация трансляции гена *wac* бактериофага Т4 (сразу же за первым фолдоном). Для амплификации и секвенирования этого фрагмента гена мы использовали олигонуклеотидные праймеры JST12up и jsNdlo (рис. 4). Исходя из степени гомологии между фолдоном фибритина бактериофага Т4 и аминокислотным мотивом, фланкирующим проклонированную нами последовательность, мы ожидали получить в результате экспрессии растворимый олигомерный и ДСН-устойчивый продукт. Однако уровень экспрессии оказался крайне низким, на уровне мажорных клеточных белков. Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что наличие аминокислотного мотива, гомологичного фолдону фибритина фага Т4 не обеспечивает быстрого принятия молекулой пг *wac* фага JS98C3 нативной конформации. Белок, находящийся в состоянии «расплавленной глобулы» в течение продолжительного времени, становится уязвимым для клеточных протеаз, чем и объясняется наблюдаемое нами небольшое количество растворимого белкового продукта.

2.6. С-концевой домен фибритина фага JS98C3. Для того, чтобы выяснить, способен ли С-концевой домен фибритина фага JS98C3 к самостоятельной тримеризации, мы проклонировали последовательность, кодирующую С-концевой домен в плазмидный вектор. Подобранные нами олигонуклеотидные праймеры jsCd_up jsCd2_up и jsCd_lo (рис.4) позволили нам амплифицировать и проклонировать последовательность С-концевого домена в двух вариантах: как с мотивом, гомологичным фолдону фибритина фага Т4 на N-конце, так и без него.

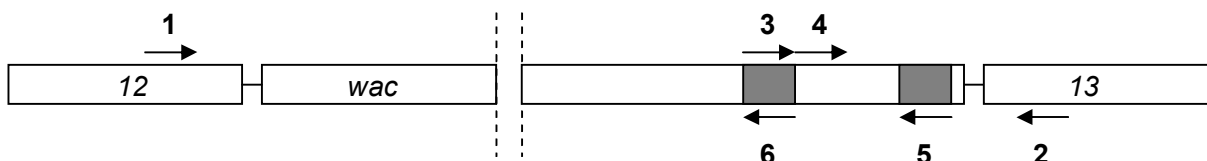


Рис. 4. Схема расположения олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе. 1 – JST12up, 2 – JSg13lo, 3 – jsCdup, 4 – jsCd2up, 5 – jsCdlo, 6 – jsNdlo. Серыми прямоугольниками отмечены последовательности, кодирующие аминокислотные мотивы, гомологичные фолдону бактериофага Т4.

В силу того, что небольшие размеры С-концевого домена представляют препятствие для его экспрессии и осложняют манипуляции по очистке, мы проклонировали кодирующие его последовательности в плазмидный вектор pET-32a, в одной рамке считывания с тиоредоксином *E. coli* (рис. 5).

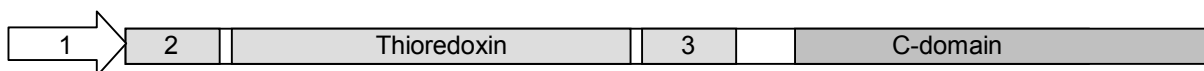


Рис. 5. Схема участка плазмидной конструкции с С-концевым доменом фибритина фага JS98C3. Цифрами обозначены: 1 – промотор T7 РНК-полимеразы; 2 – 6xHis tag; 3 – сайт узнавания сайт-специфической протеиназы тромбин.

Экспрессия С-концевого домена пг *wac* с такой относительно крупной глобулярной структурой как тиоредоксин на N-конце также позволяет оценить его способность образовывать стабильные химерные тримеры.

Таким образом, нами были получены плазмидные конструкции рETCd (С-концевой домен обоими фолдонами) и рETCd2 (тот же домен без N-концевого фолдона). Соответствие нуклеотидной последовательности вставок расчетным последовательностям в обеих конструкциях было проверено секвенированием.

Белки, представляющие собой варианты С-концевого домена фибритина фага JS98C3, экспрессировались в *E. coli* в количестве, превышающем 40% суммарного клеточного белка. Их электрофоретическая подвижность в 15% ДСН-ПААГ в прогретых образцах соответствовала предсказанной молекулярной массе (рис. 6). Не прогретые перед нанесением образцы дали на ПААГ полосы, характерные для олигомерных белков, в верхней части геля. Мы очистили белки из осветленного лизата путем аффинной хроматографии на Co-NTA, после чего отщепили тиоредоксин гидролизом их сайт-специфической протеиназой тромбин. Следующий цикл очистки на Co-NTA позволил нам очистить белки от тиоредоксина, который остался связанным со смолой. Целевые белки прошли через колонку в свободном объеме сорбента. После промывки промывочным буфером, мы элюировали тиоредоксин имидазолом, для того, чтобы убедиться в полноте гидролиза тромбином.

Не прогретые перед нанесением на ПААГ образцы элюата не показали аномальной подвижности, характерной для олигомеров, в то время как образцы целевого белка из фракции «проскока» этим свойством обладали. Это говорит о том, что гидролиз рекомбинантных вариантов С-концевого домена пг *wac* прошел полностью.

В процессе очистки варианта С-концевого домена пг *wac* без N-концевого фолдона, нами было показано его уникальное свойство: частично сохранять условно нативную конформацию после прогревания образца с ДСН до 90°C в течении 5-6 минут. Полная утрата олигомерной конформации данным белком происходила только прогревания его препарата с ДСН-буфером в течении 10-12 минут.

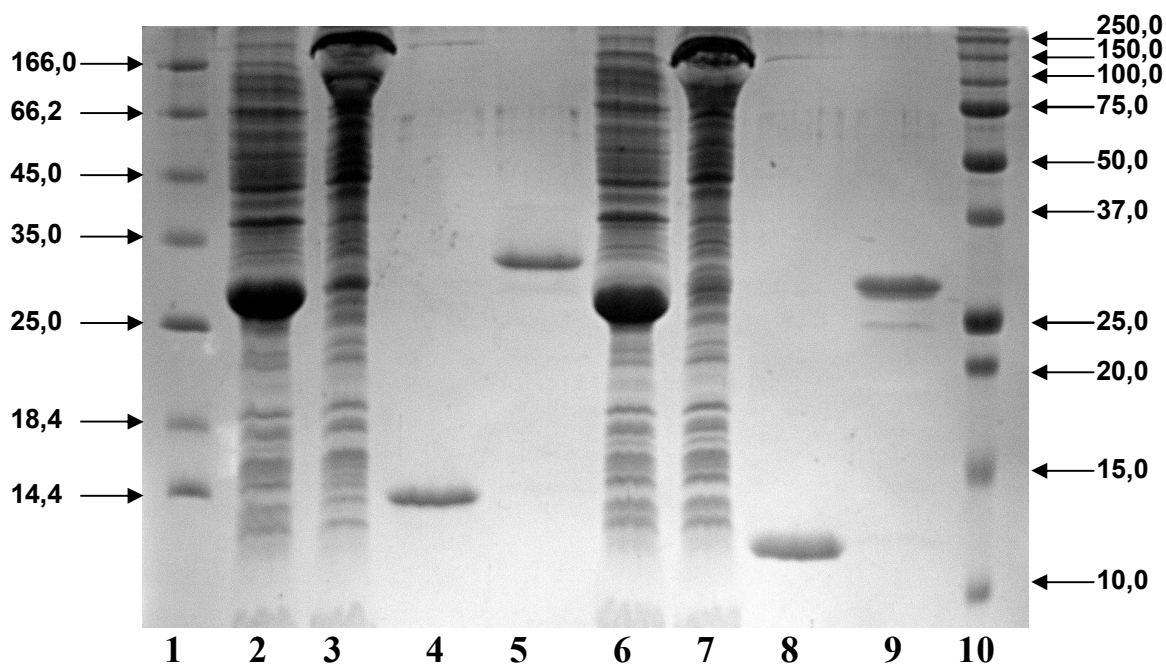


Рис. 6. Анализ очистки вариантов С-концевого домена фибритина бактериофага JS98C3 в 17% ДСН-ПААГ. Порядок нанесения: 1, 10 – маркеры молекулярной массы; 2, 6 – тотальный препарат белков: с двумя фолдонами и без первого фолдона соответственно; 3, 7 – те же препараты, не прогретые перед нанесением; 4, 8 – второй этап очистки на Co-NTA (после гидролиза тромбином) с двумя фолдонами и без первого фолдона соответственно; 5, 9 – те же препараты, не прогретые перед нанесением.

Подобное свойство, ранее показанное только для фолдона пг 5 бактериофага Т4 (К.А. Мирошников, личное сообщение) говорит об очень высокой энергии, необходимой для плавления данного домена, либо о его способности к очень быстрой эффективной тримеризации, и может быть использовано для конструирования химерных тримерных белков.

2.7. Спектроскопия кругового дихроизма. Нами были сняты спектры кругового дихроизма полноразмерного фибритина фага JS98C3 и его делеционных вариантов. Математическая обработка полученных спектров показала высокое содержание альфа-спиральных вторичных структур во всех исследованных образцах. Эти данные подтверждают наши предположения о высоком сходстве между вторичными и третичными структурами фибритинов бактериофагов Т4 и JS98C3. Обращает на себя внимание резкое отличие в соотношениях альфа- и бета- структур между двумя делеционными вариантами С-концевого домена фибритина. Выявленное большее количество альфа-спиралей в варианте С-концевого домена фибритина с одним фолдом говорит в пользу того, что отсутствующий в этом белке N-концевой фолдон действительно представляет собой бета-пропеллерную структуру (рис. 7, табл. 1).

Табл. 1.

Содержание элементов вторичных структур в целевых белках, рассчитанное по данным спектроскопии кругового дихроизма.

Образец	Содержание элементов вторичной структуры, %			
	альфа-спираль	бета-лист	Бета-поворот	непериодическая
Полноразмерный фибритин	38	16	18	28
С-концевой домен с двумя фолдонами	25	20	22	33
С-концевой домен с одним фолдоном	42	16	14	28

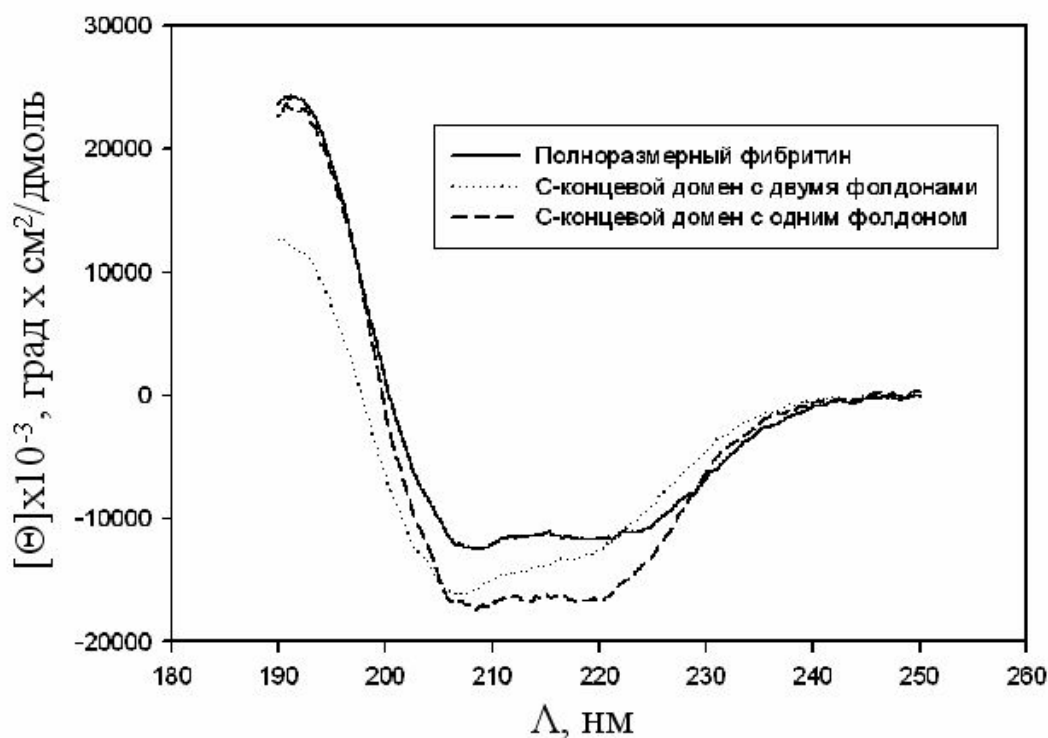


Рис.7. Спектры кругового дихроизма в дальней УФ области фибритина фага JS98C3 и его делеционных вариантов.

2.8. Поиск последовательностей, гомологичных фолдону фибритина фага T4 в GenBank. Современные данные говорят о том, что фолдон фибритина бактериофага T4 представляет собой энергетически выгодное и очень стабильное состояние белковой молекулы (Guthe *et al.*, 2004). Ранее эта структура считалась уникальной. Обнаруженные нами в фибритине фа-

га JS98C3 аминокислотные последовательности имеют высокую степень гомологии с фолдоном фибритина фага Т4, а показанные физическими методами их свойства говорят об их сходной функциональной нагрузке.

Факт того, что в фолдонах фаговых фибрилл возможны отклонения от «канонической» последовательности фолдона фибритина фага Т4, позволил нам сделать предположение о возможной широкой распространенности различных вариантов данного фолдона. В связи с этим, нами был произведен поиск гомологий в базе данных GenBank.

Для поиска нами была использована программа BLAST. В качестве матрицы для запроса мы использовали аминокислотные последовательности фолдонов пг *wac* фага Т4, а также изолированного нами фага JS98C3. Извлеченные таким образом из базы данных последовательности были выровнены при помощи программы ClustalW 1.4. (рис. 8).



Рис. 8. Выравнивание аминокислотных последовательностей выявленных нами гомологов фолдона фибритина фага Т4.

Данные гомологи были выявлены не только в последовательностях фибритинов бактериофагов, родственных Т4, но и в предполагаемых аминокислотных последовательностях белков некоторых бактериофагов, относящихся к семейству *Siphoviridae*. Обращает на себя тот факт, что в нескольких случаях, при больших размерах белка, фолдон-подобные по-

следовательности встречались неоднократно, например, в белке хвостовой фибриллы бактериофага ВсерNazgul или в фибритине родственного Т4 фага *Aeh1*. Кроме того, последовательность, гомологичная фолдону фибритина Т4 была обнаружена в предсказанной аминокислотной последовательности гипотетического белка GbemDRAFT_3444 бактерии *Geobacter bemidjiensis* Bem.

2.9. Моделирование вторичных и третичных структур фолдонов фибритина бактериофага JS98C3 *in silico*. Мы смоделировали вторичные и третичные структуры фолдонов фибритина фага JS98C3 при помощи программы Chimera. В качестве матрицы для построения структур нами была использована pdb-модель фолдона фибритина фага Т4 1RFO (рис. 9), депонированная в базе данных Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) под номером PF07921.

Моделирование *in silico* возможных вторичных и третичных структур фолдонов фибритина бактериофага JS98C3 показало высокую степень их сходства с вторичными и третичными структурами фолдона фибритина фага Т4.

Построенные нами модели с некоторой степенью достоверности объясняют результаты экспериментов с экспрессией делеционных вариантов пг *wac* фага JS98C3:

- 1) Недостаточная эффективность фолдинга, а, следовательно, и низкий уровень экспрессии варианта фибритина без части С-концевого домена можно объяснить более релаксированной по сравнению с фолдоном фибритина фага Т4 структурой N-концевого фолдона (рис.9, 10).
- 2) Сохранение частично олигомерного состояния С-концевого домена после прогревания с ДСН возможно объяснить наличием в С-концевом фолдоне дополнительному альфа-спирального участка, не характерного для фолдона фибритина фага Т4. Этот участок предположительно стабилизирован относительно полипептидной цепи двумя водородными связями, и придает третичной структуре фолдона дополнительную жесткость, а также повышает температуру его плавления (рис. 11, 12,13)

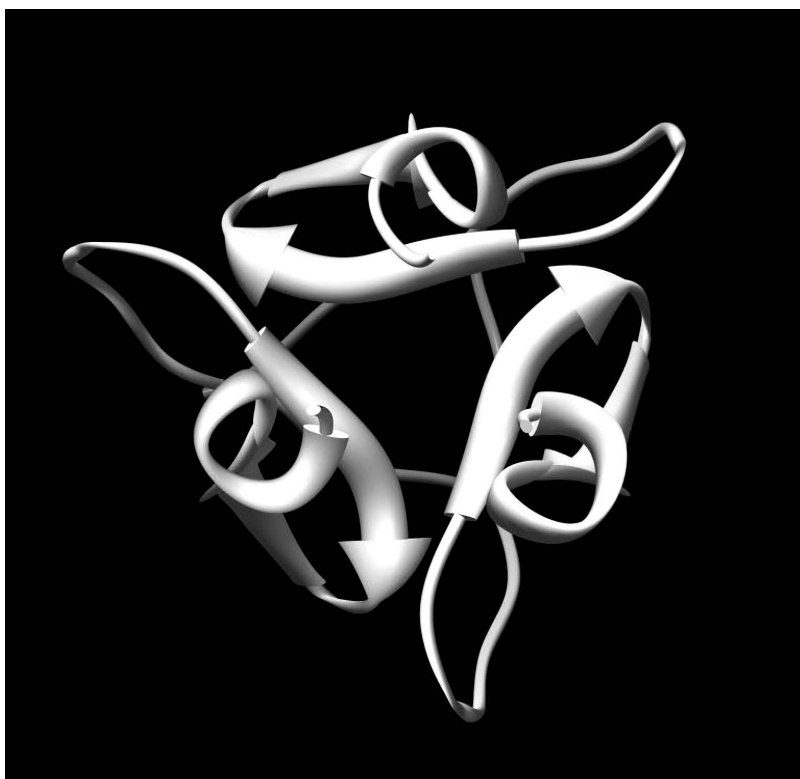


Рис. 9. Модель четвертичной структуры фолдона фибритина фага T4.



Рис. 10. Модель четвертичной структуры первого фолдона фибритина фага JS98C3.



Рис. 11. Модель четвертичной структуры второго (С-концевого) фолдона фибритина фага JS98C3. Стрелкой показан дополнительный участок альфа-спирали.

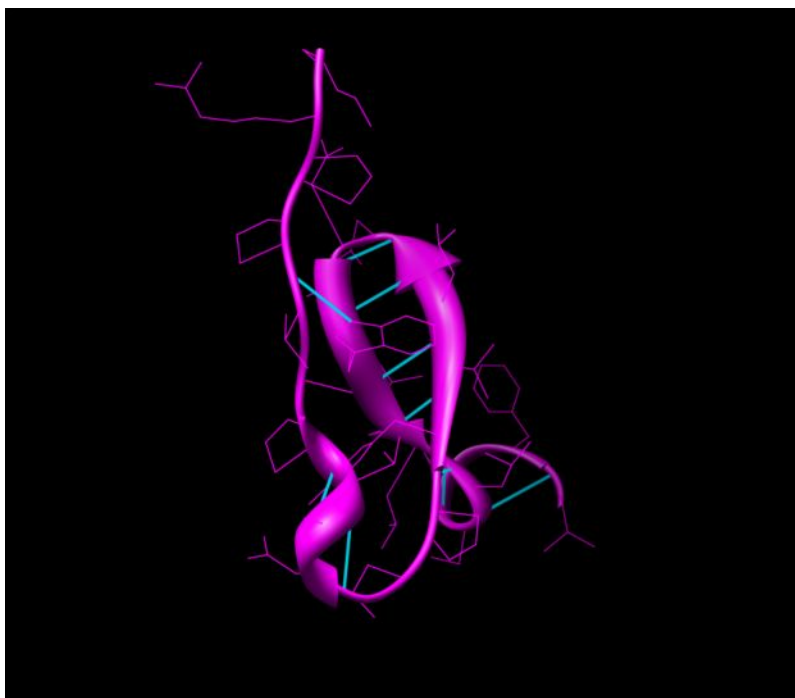


Рис. 12. Предсказанная третичная структура С-концевого фолдона фибритина фага JS98C3. Показаны водородные связи.

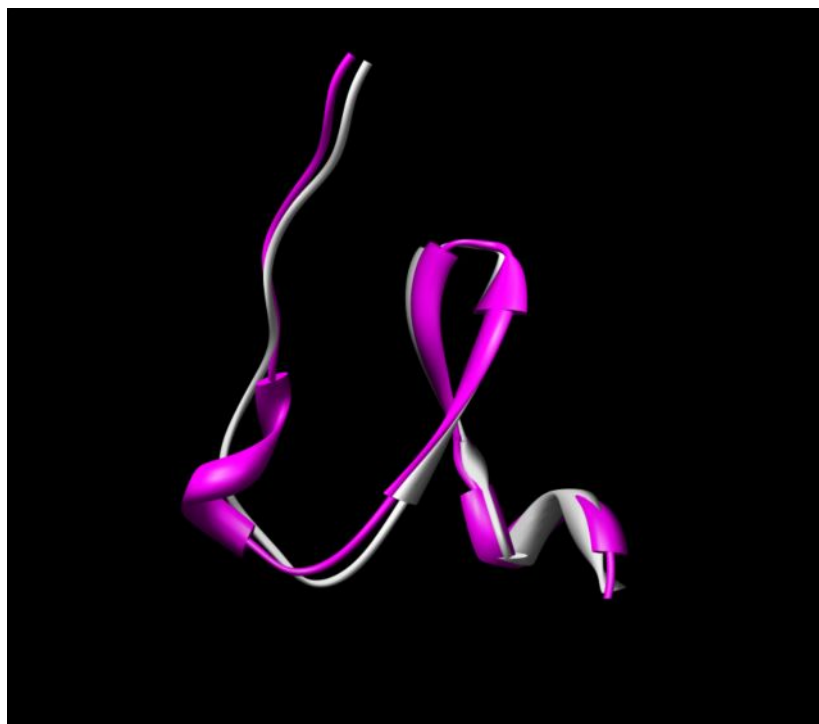


Рис. 13. Наложение третичной структуры фолдона фибритина фага T4 и С-концевого фолдона фибритина фага JS98C3. Светло-серым цветом обозначен фолдон фибритина фага T4.

4. Выводы

1. Изолирован новый T4-подобный энтеробактериофаг JS98C3. В последовательности фибритина этого бактериофага обнаружены аминокислотные мотивы, имеющие высокую степень гомологии с фолдоном фибритина фага T4.

2. Показано, что С-концевой домен фибритина бактериофага JS98C3 способен к эффективной автономной тримеризации, что делает перспективным использование входящих в его состав фолдонов в белковой инженерии в качестве модулей, инициирующих фолдинг химерных белков.

3. В результате проведенного поиска в базе данных GenBank выявлено 16 новых аминокислотных мотивов, гомологичных фолдону фибритина фага T4. Девять из вновь обнаруженных последовательностей находятся в последовательностях белков, не родственных фибритину, бактериофагов, относящихся к семейству *Siphoviridae*, что говорит о широкой распространенности подобных структур.

4. *In silico* моделирование вторичных и третичных структур вновь обнаруженных нами в GenBank аминокислотных мотивов подтвердило пред-

положение о сходстве их конформации с фолдоном фибритина бактериофага Т4, что может свидетельствовать об их сходной роли в фолдинге соответствующих белков.

Список публикаций по теме диссертации

1. **Латыпов О.Р.** Характеристика продукта гена *wac* бактериофага JS98C3, близкородственного фагу JS98 / **О.Р. Латыпов**, А.К. Голомидова, А.В. Летаров // Ученые записки Казанского Государственного Университета, 2007, том 149, кн. 4. стр. 112-121.
2. **Латыпов О.Р.** Бактериофаг Т4 и семейство Т4-подобных бактериофагов. Основы современной классификации бактериофагов, родственных Т4 / **О.Р. Латыпов**, Д.И. Тазетдинова // деп. в ВИНТИ, 07.02.08, № 94-B2008.
3. **Латыпов О.Р.** Особенности структурной организации фибритина бактериофага JS98C3 / **О.Р. Латыпов**, Д.И. Тазетдинова, А.В. Летаров // деп. в ВИНТИ, 06.02.08, № 89-B2008.
4. **Латыпов О.Р.** Особенности фолдинга фибритина бактериофага *Aeh1*: роль продуктов дополнительных открытых рамок считывания и внутренних фолдонов / **О.Р. Латыпов**, Е.Е. Куликов, Г.М. Криш, А.В. Летаров // I Международная молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии». Тезисы докладов. - Москва, 2005. - С. 74.
5. Ботвинник Е.О. Новая мутация, приводящая к фенотипической компенсации взаимодействия фибритин-ДХФ бактериофага Т4 / Е.О. Ботвинник, **О.Р. Латыпов**, А.В. Летаров. // II Международная молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии». Тезисы докладов. - Москва, 2006. - С. 62.
6. **Латыпов О.Р.** Характеристика вирусных сообществ термальных источников кальдеры Узон (Камчатка) / **О.Р. Латыпов**, Е.С. Барина, Е.Е. Куликов, А.В. Летаров. // II Международная молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии». Тезисы докладов. - Москва, 2006. - С. 25.
7. Letarov A. The function and evolution of fibrins in T4-related phages: C-end of the story / A. Letarov, **O. Latypov**. and H.M. Krisch. //1st Texas – Evergreen Phage/Virus Genomics and Ecology Meeting. Book of Abstracts, - Kingsville, Texas, 2006. - p.9.
8. Тазетдинова Д.И. Перспективные методы сельскохозяйственной биотехнологии / Д.И. Тазетдинова, Ф.К. Алимова, **О.Р. Латыпов**, Р.И. Тухбатова, А.Х. Яппаров // Рекомендации. - Казань, 2008. - С. 11-24.

Благодарности

Автор приносит свою искреннюю благодарность Ольге Воронцовой (ИБХ РАН) за помощь в получении спектров кругового дихроизма, а также Максиму Фильчикову (ИБХ РАН) за помощь в построении моделей вторичных и третичных структур.